

## Aluminum Oxide, Calcium Oxide, Sodium Tetraborate의 미생물복귀돌연변이시험

임경택<sup>†</sup> · 김수진 · 김종규 · 김현영 · 양정선

한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 화학물질안전보건센터

## Bacterial Reverse Mutation (AMES) Test of Aluminum Oxide, Calcium Oxide, and Sodium Tetraborate

Kyung-Taek Rim<sup>†</sup>, Soo-Jin Kim, Jong-Gyu Kim, Hyeon-Yeong Kim, and Jeong-Sun Yang

Chemical Safety&Health Center, Occupational Safety&Health Research Institute, Korea Occupational Safety & Health Agency,  
Daejeon 305-380, Korea

Received June 3, 2009, accepted September 23, 2009

We investigated the genotoxicities or mutagenicities of 3 chemicals, i.e., aluminum oxide, calcium oxide, and sodium tetraborate. We have limited toxicological data in spite of their common usage based on Ames reverse mutation test. In this study, treatment of 3 chemicals at the dose of 5,000, 2,500, 1,250, 625, and 312.5 µg/plate did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, and in *Escherichia coli* WP2uvrA with and without metabolic activation. These results indicate that the 3 chemicals do not have mutagenic potentials under the conditions of this study. However, further investigations were necessary because it may harmful to workers by ingestion, inhalation, skin or eye contact. And it is also desirable to prepare the local exhaust system and to wear personal protection equipments.

**Key words:** reverse mutation, aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate

### 1. 서 론

산업구조가 다양화함에 따라 화학물질의 사용량 및 종류가 폭발적으로 증가하고 새로운 화학물질의 수입 또는 개발이 이루어지고 있다. 이러한 현상의 여파로 인해 이들 물질의 혼합제품은 수 십만 종에 달하고 있는 상황이다. 이에 따른 부작용으로 독성이 높은 유해 화학물질의 수요는 급증하고 있음에도, 유해성의 검증을 하기도 전에 생산공정에서 이들을 사용하고 있는 실정이다. 또한, 대부분의 화학물질은 유해성 자료가 없는 상태로 유통하고 있어 취급근로자에게 직업병, 화재폭발, 맹독성 물질에 의한 질식 등의 사고가 빈발하고 있다<sup>1)</sup>.

따라서 현행 화학물질관리체계에 대한 국가주도의 중

합적이고 체계적인 새로운 관리방안이 절실히 필요하다. 모든 화학물질은 잠재적으로 유해하다는 관점에서 볼 때, 화학물질을 유해성별로 분류하여 적절하게 사전 예방하는 것이 무엇보다 중요한 과제이다. 이를 위해서는 그 화학물질의 유해성을 충분히 숙지하여야 만약의 사고에 신속히 대응할 수 있게 된다. 특히 화학물질로 인한 사고는 직업병, 화재폭발 등으로 인한 피해와 같이 그 회복이 극히 어렵다는 점에서 매우 심각하다고 할 수 있다.

유전독성시험은 시험물질의 유전독성 및 발암원성을 예측하는데 그 목적이 있는 여러 가지 시험법을 말하며, 그 중 복귀돌연변이성을 이용한 Ames 시험법은 동 시험법의 개발자인 B. N. Ames라는 사람의 이름을 딴 시험법으로<sup>2)</sup>, 히스티딘을 필요로 하는 박테리아가 히스

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-42-869-0345, Fax: +82-42-863-9001, E-mail: ktrim@kosha.net

티딘이 필요 없는 종으로 변화하는 유전자의 변화를 이용하여 변이여부를 스크리닝하는 시험법이다. 동 시험에 사용하는 균주로는 *Salmonella typhimurium* 중 TA1535, TA1537, TA98, TA100 균주를, *Escherichia coli* 중 WP2uvrA를 이용한다. 과학적 근거가 있을 때에는 다른 균주를 추가할 수 있다. 시험원리는 균주(박테리아)를 시험물질에 노출시키고 최소배지에 이식한 후 적정기간 동안 배양하고 형성된 콜로니수를 대조군과 비교하는 것이다. 시험물질의 최고농도는 항균작용과 용해도를 고려하여 설정한다. 원칙적으로 항균작용이 나타나는 농도를 상한선으로 하여 적어도 5단계의 간격으로 용량을 설정한다. 항균성이 나타나지 않을 경우에는 원칙적으로 5 mg/plate를 최고한도로 한다. 시험방법은 전배양(preincubation)법, plate법 어느 것으로도 실시할 수 있다. 각 용량에 대해서 2배 이상의 플레이트를 이용하며, 동시에 적절한 대사활성화제(Rat, 9,000xg 상등액 등)를 첨가한 조건에 있어서도 동일한 시험을 실시한다. 음성대조로서 원칙적으로 용매를 이용하고, 양성대조로서 적절한 기지의 변이원성 물질을 이용한다. 시험결과의 처리는 복귀돌연변이 집락수의 실측치와 평균치 및 표준편차를 표시하고, 복귀돌연변이 콜로니의 수가 음성대조에 비하여 명확히 2배 이상 이면서, 용량의존성을 가지며, 그 작용에 재현성이 인정가능한 경우 양성으로 판정한다.

시험결과의 보고는 국립환경과학원 고시 제2007-29호 「화학물질유해성 시험 연구기관의 지정등에 관한 규정」 및 노동부 고시 제2008-11호 「산업화학물질의 유해·위험성시험 등에 관한 기준」 별표6 제10항 유전독성시험에 의거 시험기관의 명칭 및 소재지, 시험책임자 및 담당자 성명, 시험균주의 종, 시험조건(시험농도 및 시험농도 설정의 근거, 시험당 plate수, 배지 조성, 대사활성화제, 처리과정, 음성양성대조군), 플레이트당 복귀돌연변이균주의 수, 통계처리법 등을 보고하도록 하고있다<sup>3,4)</sup>.

본 연구에서는 국내에서 사용중인 화학물질 중 국내 외적으로 급성독성자료가 불충분하며 그 유해성의 정확한 평가가 이루어지지 못한 물질로 사용량과 취급 근로자수가 많아 노출로 인해 호흡기계 이상 등의 위험이 증가할 수 있는 물질들을 대상으로 하였다. 특히 정확한 유해성의 평가가 필요한 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate 등 3개의 화학물질에 대해 유전독성시험 중 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험을 실시하여 발암성 및 변이원성의 예측 등에

활용하고자 하였다.

대표적인 금속산화물인 aluminum oxide는 Alundum, Alumina 또는 Dialuminum trioxide라고도 불리며, 분자식은 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>이다. 분자량은 101.96, 융점 2,053~2,072 °C, 비점 2,980°C, 증기압 1 mmHg(2,158°C), 비중 3.965(25°C)를 갖는 무취, 흰색에서 회색까지의 분말로 휘발성은 0.5% 이하이고, 물에는 불용성, 용매 중 무기산이나 강알칼리에는 약용해성을 띤다. CAS No.는 1344-28-1, RTECS No.는 BD1200000, EN No.는 215-691-6이다<sup>5)</sup>. 기존화학물질목록에 KE-01012로 등재되어 있으며, 양쪽성산화물이므로 산이나 알칼리에도 반응한다. 천연으로는 α-알루미나의 광물인 코런덤, 사파이어(백색) 및 수화물인 보크사이트 등의 형태로 산출되고, 공업적으로는 수산화알루미늄을 가열하여 생성한다. 알루미늄금속의 제조, 연마제(코런덤) 또는 알콜탈수용 촉매 등으로 사용하고 있다<sup>6)</sup>.

표적장기에 대한 주요 영향은 보고된 바 없고, 흡입 노출로 인한 자극, 금속 흡 열, 호흡곤란, 피부 및 눈 접촉으로 인한 자극 등의 잠재적 영향이 있을 수 있다. 발암성은 ACGIH-A4(자료 불충분으로 인체 발암물질로 분류되지 않음)로 구분하고 있다.

국내의 노출기준으로는 산업안전보건법 TWA 10 mg/m<sup>3</sup><sup>7)</sup>, 5 mg/m<sup>3</sup> OSHA TWA(호흡성 분진), 15 mg/m<sup>3</sup>, OSHA TWA(총분진), 10 mg/m<sup>3</sup> ACGIH TWA, 1.5 mg/m<sup>3</sup> DFG MAK(호흡성 분진-흡)으로 설정되어 있다. 산업안전보건법 상의 노출기준설정물질이지만, 유해화학물질관리법이나 위험물안전관리법에 규정받지 않는 물질로 CERCLA, SARA 등의 CFR 규정 및 OSHA 규정에서도 규제대상이 아니며, 미국물품목록인 TSCA에만 등재되어 있다.

Calcium oxide는 석회로 Calcia, Calxyl 또는 Lime 이라고도 불리며, 분자식은 CaO이다. 분자량은 56.08, 융점 2,614°C, 비점 2,850°C, 비중 3.25~3.38인 무취, 흰색이거나 회색의 고체로 물과 반응하고, 글리세롤과 설탕 용액에는 가용성, 알콜에는 불용성이다. CAS No.는 1305-78-8, RTECS No.는 EW3100000, UN No.는 1910, EN No.는 215-138-9이다<sup>5)</sup>. 기존화학물질목록에 KE-04588로 등재되어 있고, 금속칼슘을 산소중에서 연소시키거나 탄산칼슘의 열분해로 생성되며, 생석회. 금속제련시에 불순물을 슬랙스로 제거하는데 사용한다<sup>6)</sup>.

표적장기에 대한 주요 영향은 보고된 바 없고, 흡입 노출, 피부 및 눈 접촉, 섭취 등으로 인한 화상의 잠재

적 영향이 있을 수 있으며, 발암성물질 목록에는 등재되어 있지 않다. 국내외 노출기준으로는 산업안전보건법 TWA 2 mg/m<sup>3</sup><sup>7)</sup>, 5 mg/m<sup>3</sup> OSHA TWA, 2 mg/m<sup>3</sup> ACGIH TWA, 2 mg/m<sup>3</sup> NIOSH 권장 TWA(10시간)로 설정하고 있다. Aluminum oxide와 마찬가지로 산업안전보건법 상의 노출기준설정물질이지만, 유해화학물질관리법이나 위험물안전관리법에 규정받지 않는 물질로 CERCLA, SARA 등의 CFR 규정 및 OSHA 규정에서도 규제대상이 아니며, 미국물품목록인 TSCA에만 등재되어 있다. 유럽연합 규정인 EC 분류에는 부식성물질로 구분되어 있다.

Sodium tetraborate는 일반명칭으로 붕산나트륨이라고 명하고 Boron sodium oxide, Anhydrous Borax, Borax Glass라고 부르기도 한다. 분자식은 B<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 분자량은 201.22, 융점 741°C, 분해점 1,575°C, 비중 2.367, 물용해도 1.06~8.79%인 무취, 흰색 고체로 흡습성이 있다. 알콜에는 불용성을 띤다. CAS No.는 1330-43-4, RTECS No.는 ED4588000, EN No.는 215-540-4이다<sup>5)</sup>.

기준화학물질목록에 KE-12384로 등재되어 있으며, 표적장기에 대한 주요 영향은 보고된 바 없다. 흡입노출로 인한 자극, 목소리 상실, 피부 및 눈 접촉으로 인한 자극, 눈 손상, 섭취로 인한 피부장애, 구토 등의 잠재적 영향이 있을 수 있다. 발암성은 ACGIH-A4(자료 불충분으로 인체 발암물질로 분류되지 않음)로 구분하고 있다.

국내의 노출기준으로는 산업안전보건법 TWA 1 mg/m<sup>3</sup><sup>7)</sup>, 1 mg/m<sup>3</sup> ACGIH TWA, 1 mg/m<sup>3</sup> NIOSH 권장 TWA(10시간)로 설정하고 있다. 산업안전보건법 상의 노출기준설정물질이지만, 유해화학물질관리법이나 위험물안전관리법에 규정받지 않는 물질로 CERCLA, SARA 등의 CFR 규정 및 OSHA 규정에서도 규제대상이 아니며, 미국물품목록인 TSCA에만 등재되어 있다. Rat를 이용한 급성경구독성시험결과 LD<sub>50</sub>이 1,200 mg/kg으로 알려져 있다.

이와 같이 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate는 급성독성자료가 불충분하며 그 유해성의 정확한 평가가 이루어지지 못한 물질임에도 노출로 인해 호흡기계 이상 등의 위험이 증가될 수 있는 물질이어서 정확한 유해성의 평가가 필요하였다. 따라서 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate의 복귀돌연변이원성 유무를 살모넬라균과 대장균을 이용하여 예측하고자 국립환경과학원<sup>3)</sup>과 노동부<sup>4)</sup>의 해당

고시 및 OECD Test Guideline No. 471(1997)<sup>8)</sup>을 충족시키는 GLP 유전독성시험법<sup>9)</sup>에 따라 미생물복귀돌연변이(Ames) 시험을 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시험물질 및 시약

본 시험에 사용한 aluminum oxide(CAS No. 1344-28-1, 99.998%, Lot No. 04301BH), calcium oxide(CAS No. 1305-78-8, 99.99+%, Lot No. 08788KH), sodium tetraborate(CAS No. 1330-43-4, 99.998%, Lot No. 04313HE)는 Sigma-Aldrich(St. Louis MO., USA)사에서 구입하여 사용하였다. 음성대조물질(음배)은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis MO., USA, Lot No. 037K0766, 99.5%)를 사용하였다.

시험용 균주로는 염기쌍치환형(base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위하여는 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용하였다. TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA의 균주는 Molttox(BOONE, NC 28607, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 균현탁액 0.8, DMSO 0.07의 조성으로 -80°C deep freezer (MDF-U3086S, Sanyo, IL., USA)에 동결보관하여 사용하였다.

S9 Mix는 Molttox(Lot No. 2151)사로부터 구입하여 사용하였고, 수컷 Sprague Dawley rat에 유도물질인 Aroclor 1254를 도살 5일전 단회 복강투여 후 간 조직을 균일화하여 얻은 것으로, -80°C deep freezer에 동결보관하여 사용하였다.

### 2.2 복귀돌연변이시험

시험은 Ames방법<sup>2)</sup>에 준하여 수행하였고, 시험물질의 농도결정시험은 최고농도를 5,000 µg/plate로 공비 3~10으로 실시하였다. 농도결정시험의 결과를 참고로 하여, 최고농도를 생육저해가 나타나는 농도 또는 5~10 mg/plate로 공비 2~3으로 실시하였다.

확인시험은 본시험의 결과를 참조하여 공비 2~3으로 실시하였다. 표준작업지침서에 준하여 작성한 시험계획서에 따라 실시하되 시험물질을 처리한 균주를 37°C 진탕배양기에 20분간 전배양하여 실시하는 전배양(preincubation)법을 이용하는 것을 원칙으로 하였다.

아미노산 요구성, 자외선 감수성, 막변이 및 억제내성으로 이루어지는 유전적 성질을 확인하였다. 그중 아미노산 요구성은 전배양법으로, background 콜로니의 개수를 지표로 확인하였다. 자외선 감수성은 10W의 자외선등을 25 cm의 높이에서 점등하여 생육의 여부로 확인하였으며, 막변이는 crystal violet에 의한 생육정지의 유무로 확인하였다. 또한 억제내성에 대해서는 ampicillin, tetracycline에 의한 생육정지의 유무로 확인하였다.

양성대조물질을 대상으로 시험을 실시하여 복귀돌연변이 콜로니수를 측정, 대사활성화를 실시한 경우와 실시하지 않은 경우의 각 균주에 해당하는 양성대조물질의 참고치와 비교, 확인하였다.

시험에 사용한 양성대조물질은 각각 Sodium azide (WAKO, Osaka, Japan, Lot No. KJSJ6151, 98%), 9-aminoacridine(9AA) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA, Lot No. 03024JR, 98%), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF-2) (WAKO, Lot No. WAP0369, 98%), 2-aminoanthracene(2AA) (WAKO, Lot No. KSF1039, 95%)를 용매인 DMSO에 녹여 시험에 사용하였다.

시험물질용액의 조제는 DMSO를 사용하였고, 시험물질은 DMSO와 acetone에 대한 용해도가 5% 이상이고, 물에는 불용이므로 용매 휘발성이 낮은 DMSO를 용매로 선택하였다. 초음파 분산으로 제조하였으며, 시험물질들의 순도는 97% 이상이므로 순도환산은 하지 않았다.

전배양 시에는 50 ml 삼각플라스크에 nutrient broth (Oxoid, Hampshire, UK)를 이용, 진탕배양장치(Model 50, Precision, Winchester, VA., USA)로 180회/분 진탕배양하였다. 이때 배양액량은 15 ml, 접종균량은 30 µL로 하였다. Top Agar는 BD(Franklin Lakes, NJ., USA)로부터 bacto-agar(Lot No. 7144748)를, 최소 glucose agar plate는 Junsei(Tokyo, Japan)로부터 agar(Lot No. 2D1149)를 구입하여 사용하였다.

본 시험은 GLP 시험법에 따라 실시하되 전배양법으로써 대사활성화계를 이용하는 방법과 대사활성화계를 이용하지 않는 방법을 병행하여 실시하였다.

Colony 수의 측정방법은 90 mm 직경의 플레이트(내경 86 mm)에 생성된 콜로니수를 자동 Colony counter(Bio-multiscanner model BMS-400 system, 東洋測器株式會社, kanagawa, Japan)로 계수하였다. 생육저해유무의 확인방법으로는 실체현미경을 이용하여 40배

의 배율로 모든 플레이트를 관찰하여 확인하였다. 균농도의 측정방법으로는 동 센터 표준작업지침서의 단계회석법에 의한 생균수 측정으로 균 농도를 측정하였다. 무균시험으로 S9 Mix 및 시험물질용액을 0.1 ml씩 최소 glucose 한천배지에 top agar를 중층시켜 37°C에서 48시간 배양하여 균의 생육 유무를 육안으로 확인하였다. 결과해석을 위한 통계분석은 시험물질의 농도 증가와 함께 복귀돌연변이 콜로니 수가 증가하며, 또 음성대조군 결과의 2배 이상으로 증가하고 재현성이 있을 때 양성으로 판정하나 본 시험은 그와 같은 결과를 얻지 못하여 결과해석을 위한 통계학적 수법은 이용하지 않았다.

시험의 정도관리를 위해 위의 GLP시험 가이드라인을 준수하였고, 동 가이드라인에 맞춰 본 센터에서 작성한 표준작업지침서(Standard Operating Procedure)에 따라 시험하였다.

### 3. 결과 및 고찰

*Salmonella* 4개 균주의 경우 대사활성화 적용 및 비적용시 모두 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate의 3가지 시험물질 농도의 증가에 따른 콜로니 수의 증가나 항균성은 나타나지 않았다. *E. coli* WP2uvrA의 경우에도 대사활성화 적용 및 비적용시 모두 3가지 시험물질 농도의 증가에 따른 콜로니 수의 증가나 항균성이 나타나지 않았다.

농도결정시험 및 본시험을 각 시험물질의 용해도를 고려하고, 시험물질의 독성으로 생육저해를 나타내지 않는 농도인 5,000 µg/plate까지 실시하였다. 이때 시험물질 농도 증가에 따른 복귀돌연변이 콜로니수 증가 양상이 나타나지 않았다. 용매대조군의 콜로니 생성수의 2배를 초과하는 복귀돌연변이 콜로니의 상승도 대사활성화의 유무와 관계없이 관찰되지 않았다. 양성대조군에서는 각각의 균주에서 양성이라 판단한 수치범위에서 복귀돌연변이 콜로니가 유발되었으므로 각 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있었다. 이상의 결과로 3가지의 각 시험물질인 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate는 해당 균주에 대한 복귀돌연변이 시험 결과 음성으로 판단되었다.

시험물질인 aluminum oxide에 대한 본시험의 시험 결과는 Table 1에, calcium oxide에 대한 본시험의 시험 결과는 Table 2에, sodium tetraborate에 대한 본시험의 시험결과표는 Table 3에 제시하였다.

**Table 1.** Reverse mutation (*Ames*) assay using *Salmonella* and *E. coli*. treated with aluminum oxide without (upper panel) and with metabolic activation (middle panel), respectively. The lower panel is positive control (without and with metabolic activation).

With/Without S9-mix	Concentration of test material ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of reverse mutation (colony number/plate)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix(-)	0	55 69 61 (62)	7 5 5 (6)	37 33 37 (36)	8 6 16 (10)	4 6 1 (4)	
	312.5	77 67 65 (70)	5 6 6 (6)	30 38 28 (32)	8 11 10 (10)	1 2 3 (2)	
	625	76 64 62 (67)	3 7 6 (5)	35 34 36 (35)	9 11 12 (11)	3 4 3 (3)	
	1,250	71 78 64 (71)	12 1 10 (8)	32 36 30 (33)	21 14 13 (16)	5 1 1 (2)	
	2,500	68 62 68 (66)	8 8 5 (7)	46 37 25 (36)	16 9 15 (13)	4 2 7 (4)	
	5,000	69 63 83 (72)	5 9 5 (6)	42 45 38 (42)	7 9 17 (11)	7 1 4 (4)	
S9Mix(+)	0	88 86 88 (87)	4 8 9 (7)	46 39 41 (42)	23 19 28 (23)	11 6 3 (7)	
	312.5	90 90 90 (90)	12 12 6 (10)	41 42 45 (43)	14 25 22 (20)	6 9 7 (7)	
	625	89 102 85 (92)	10 9 4 (8)	39 34 27 (33)	18 19 13 (17)	5 3 4 (4)	
	1,250	85 96 85 (89)	11 7 4 (7)	51 28 40 (40)	23 23 22 (23)	6 5 5 (5)	
	2,500	97 87 80 (88)	12 7 8 (9)	39 49 37 (42)	12 13 13 (13)	6 8 3 (6)	
	5,000	87 92 83 (87)	7 5 8 (7)	75 61 30 (55)	6 14 9 (10)	5 8 9 (7)	
+ Control	Strain	AF-2	NaN3	AF-2	AF-2	9-AA	
	Without S9Mix	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Colony number/plate	321 315 320 (319)	316 325 301 (314)	178 189 171 (179)	379 370 367 (372)	1021 990 1010 (1007)
		Strain	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	With S9Mix	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1.0	2.0	10	0.5	2.0
		Colony number/plate	571 560 558 (563)	202 210 214 (209)	570 562 557 (563)	379 368 370 (372)	189 192 185 (189)

( ) : mean value

S9 Mix의 첨가 유무 즉, 대사활성화법을 이용한 시험과 이용하지 않은 시험 사이에는 *in vitro* 시험에 시험물질의 *in vivo*에서 예상되는 대사경로를 적용하기 위하여 약물대사 효소계(S9 mix)를 첨가하여 시험물질

의 대사산물에 의한 영향을 보기 위한 방법으로, S9 mix는 랫트에 적절한 약물대사 효소계의 유도체를 투여한 후 간으로부터 조제하며, 이 S9에 보조효소 등을 넣은 S9 mix를 이용한다. 대부분의 미생물 균주를 이

**Table 2.** Reverse mutation (*Ames*) assay using *Salmonella* and *E. coli*. treated with calcium oxide without (upper panel) and with metabolic activation (middle panel), respectively. The lower panel is positive control (without and with metabolic activation).

With/Without S9-mix	Concentration of test material ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of reverse mutation (colony number/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix(-)	0	100 88 78 (89)	12 7 11 (10)	38 32 38 (36)	29 31 22 (27)	18 7 8 (11)
	312.5	111 86 80 (92)	9 13 13 (12)	40 35 34 (36)	33 38 28 (33)	13 7 11 (10)
	625	76 88 89 (84)	12 9 10 (10)	39 34 33 (35)	22 36 33 (30)	15 6 12 (11)
	1,250	72 64 70 (69)	11 10 6 (9)	37 39 31 (36)	28 25 31 (28)	4 7 3 (5)
	2,500	15 30 26 (24)	5 8 9 (7)	11 7 6 (8)	3 12 5 (7)	2 0 3 (2)
	5,000	13 25 20 (19)	0 5 7 (4)	3 6 1 (3)	0 0 4 (1)	0 0 0 (0)
S9Mix(+)	0	80 86 90 (85)	5 7 10 (7)	40 38 37 (38)	42 39 36 (39)	12 25 22 (20)
	312.5	100 89 98 (96)	21 16 12 (16)	39 42 38 (40)	41 45 34 (40)	27 30 15 (24)
	625	119 101 107 (109)	10 17 11 (13)	35 31 36 (34)	31 40 37 (36)	27 20 8 (18)
	1,250	117 93 87 (99)	12 14 9 (12)	31 33 34 (33)	30 48 45 (41)	20 15 9 (15)
	2,500	99 98 58 (85)	8 12 7 (9)	36 37 40 (38)	41 42 35 (39)	14 10 17 (14)
	5,000	93 2 0 (32)	10 10 0 (7)	17 5 0 (7)	20 0 2 (7)	17 13 15 (15)
Control	Strain	AF-2	NaN3	AF-2	AF-2	9-AA
	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
+	Colony number/plate	310 316 308 (311)	370 364 360 (365)	151 170 168 (163)	311 305 318 (311)	1003 1020 996 (1006)
	Strain	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Control	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1.0	2.0	10	0.5	2.0
	Colony number/plate	681 690 672 (681)	142 150 141 (144)	333 330 311 (325)	400 423 415 (413)	147 151 139 (146)

( ) : mean value

용한 *in vitro* 시험에서는 S9 mix를 첨가한 대사활성화법을 병행하여 수행한다. 본 연구에서 시험한 3개 시험물질은 대사활성화를 실시한 경우와 실시하지 않은 경우의 각 균주에 해당하는 양성대조물질의 참고치와 비교, 확인하였다. 두 경우에서 모두 시험물질의 농도

증가와 함께 복귀돌연변이 콜로니 수가 음성대조군 결과의 2배 이상으로 증가하고, 재현성이 있을 때 양성으로 판정하나 본 시험은 그와 같은 결과를 얻지 못하여 음성으로 판정하였다. 시험에 사용한 균주간의 농도에 따른 콜로니 증가 비교는 *Salmonella* 4개 균주 및 *E.*

**Table 3.** Reverse mutation (*Ames*) assay using *Salmonella* and *E. coli*. treated with sodium tetraborate without (upper panel) and with metabolic activation (middle panel), respectively. The lower panel is positive control (without and with metabolic activation).

With/Without S9-mix	Concentration of test material ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of reverse mutation (colony number/plate)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix(-)	0	62 61 62 (62)	10 4 9 ( 8)	40 39 40 (40)	16 25 22 (21)	7 1 9 ( 6)	
	312.5	64 61 53 (59)	5 9 4 ( 6)	35 42 36 (38)	27 27 24 (26)	6 2 11 ( 6)	
	625	73 73 71 (72)	2 6 3 ( 4)	36 47 50 (44)	23 21 12 (19)	3 4 9 ( 5)	
	1,250	75 75 62 (71)	4 4 5 ( 4)	49 40 54 (48)	27 30 40 (32)	8 4 4 ( 5)	
	2,500	87 89 86 (87)	2 8 9 ( 6)	54 52 57 (54)	28 18 38 (28)	8 4 11 ( 8)	
	5,000	85 91 90 (89)	6 3 7 ( 5)	46 46 45 (46)	22 18 22 (21)	6 8 5 ( 6)	
S9Mix(+)	0	86 88 74 (83)	8 9 9 ( 9)	40 37 39 (39)	42 29 35 (35)	8 10 8 ( 9)	
	312.5	81 83 82 (82)	8 6 9 ( 8)	41 42 34 (39)	30 33 35 (33)	5 9 7 ( 7)	
	625	75 77 79 (77)	6 9 6 ( 7)	51 52 46 (50)	33 23 39 (32)	6 2 8 ( 5)	
	1,250	73 79 92 (81)	13 6 12 (10)	42 43 60 (48)	35 34 40 (36)	1 4 11 ( 5)	
	2,500	74 69 95 (79)	4 8 9 ( 7)	45 59 48 (51)	39 28 31 (33)	10 4 6 ( 7)	
	5,000	95 89 86 (90)	3 4 10 ( 6)	63 52 57 (57)	29 26 39 (31)	4 7 2 ( 4)	
+ Control	Strain	AF-2	NaN3	AF-2	AF-2	9-AA	
	Without S9Mix	With S9Mix	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Colony number/plate	318 310 322 (317)	230 240 237 (236)	140 140 130 (137)	244 250 232 (242)	1000 990 1012 (1001)	
	Strain	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	With S9Mix	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1.0	2.0	10	0.5	2.0
	Colony number/plate	575 560 549 (561)	131 138 142 (137)	554 562 570 (562)	254 260 251 (255)	161 140 150 (150)	

( ) : mean value

*coli* WP2uvrA의 경우에도 대사활성화 적용 및 비적용 시 모두 3가지 시험물질 농도의 증가에 따른 콜로니 수의 증가는 나타나지 않았다.

시험에 사용한 음성(용매)대조 및 양성대조시험은 historical data와 비교하여 적절한 값을 나타내고, 또한

양성대조는 음성대조치의 2배 이상을 보여주어야 올바르게 시험이 진행되었다고 볼 수 있다. 본 연구에서도 이와 같은 양상을 보여 시험과정이 적절히 수행되었음을 알 수 있어 3개 시험물질이 동 미생물복귀돌연변이 (*Ames*) 시험에서 음성으로 나타난 결과의 신빙성을 높

여주고 있다. 그러나 본 연구결과는 유전독성평가에 주로 이용하는 여러 시험들 중 한 가지로, 복귀돌연변이 시험을 이용한 화학물질의 유해성 평가는 다른 화학물질로도 수행한 바 있다<sup>10)</sup>. 하지만 복귀돌연변이시험의 음성이라는 결과가 곧 그 화학물질의 유전독성(변이원성 및 발암성)이 전무하다고 선불리 판단하기에는 부족함이 있다. 동 시험물질의 노출에 의해 호흡기계 이상, 피부 질환 및 알레르기 등의 위험이 증가할 수 있으며, 특히 sodium tetraborate의 경우 중추신경계 및 신장을 그 표적장기로 하고 있어<sup>5)</sup> 실제 작업장에서 동 물질의 취급 시에는 국소배기장치 등을 설치하는 등 환기를 철저히 하고, 근로자의 눈 보호를 위한 보안경 및 관련 사고를 대비한 세안설비와 비상세척설비(샤워식)를 설치하여야 한다. 또한 근로자는 적절한 내화학성 보호의 및 안전장갑을 착용하여야 하며, 사용빈도가 높거나 노출이 심한 경우에는 송기마스크, 공기호흡기 등의 호흡용 보호구를 착용하여 화학물질로 인한 사고 및 질병에 적극 대비하여야 한다. 또한 급성독성영향 뿐만 아니라 저농도 장기노출시의 근로자 건강영향 평가를 위한 만성흡입독성시험, 발암성시험 등이 추가로 수행되어야 할 것이다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 국내에서 사용되는 화학물질 중 국내 외적으로 급성독성자료가 불충분하며 그 유해성의 정확한 평가가 이루어지지 못한 물질로 사용량과 취급 근로자수가 많아 노출로 인해 호흡기계 이상 등의 위험이 증가될 수 있는 물질로 정확한 유해성의 평가가 필요한 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate 등의 3개 화학물질에 대해 유전독성시험 중 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험을 통하여 발암성 및 변이원성의 예측 등에 활용하고자 하였다.

위 3개 물질의 복귀돌연변이원성 유무를 살모넬라 균과 대장균을 이용하여 예측하고자 국립환경과학원과 노동부의 해당 고시 및 OECD Test Guideline No. 471(1997)을 충족시키는 GLP 유전독성시험법에 따라 미생물복귀돌연변이(Ames) 시험을 실시하였으며, 3가지의 각 시험물질은 해당 균주에 대한 복귀돌연변이시험 결과 음성으로 판단되었다.

그러나 본 연구결과는 유전독성평가에 주로 이용되는 여러 시험들 중 한 가지를 수행한 것으로 복귀돌연변이

시험의 음성이라는 결과가 곧 그 화학물질의 유전독성(변이원성 및 발암성)이 전무하다고 선불리 판단하기에는 부족함이 있다. 동 시험물질의 노출에 의해 호흡기계 이상, 피부 질환 및 알레르기 등의 위험이 증가할 수 있으며, 특히 sodium tetraborate의 경우 중추신경계 및 신장을 그 표적장기로 하고 있어 실제 작업장에서는 국소배기장치 등의 환기설비 설치 및 보호구를 착용하여 화학물질로 인한 사고 및 질병에 적극 대비하여야 하고, 또한 급성독성영향 뿐만 아니라 저농도 장기노출시의 근로자 건강영향 평가를 위한 만성흡입독성시험, 발암성시험 등이 추가로 수행되어야 할 것이다.

#### 감사의 글

본 연구는 노동부 및 한국산업안전보건공단의 산업화학물질 관리지원 및 화학물질 유해성평가 사업의 일환으로 수행되었습니다.

#### 참고문헌

1. 황호순, 물질안전보건자료제도 실무, 한빛미디어, 2000.
2. Maron, D.M. and Ames, B.N. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Res.* **1983**, 113, 173-215.
3. 국립환경과학원 고시 제2007-29호 「화학물질유해성 시험 연구기관의 지정등에 관한 규정」, **2007**.
4. 노동부 고시 제2008-11호 「산업화학물질의 유해·위험성시험 등에 관한 기준」 별표6 제10항 유전독성시험, **2008**.
5. 한국산업안전보건공단 aluminum oxide, calcium oxide, sodium tetraborate의 물질안전보건자료(MSDS), 안전보건정보서비스(KOSHANET), **2007**. <http://www.kosha.net/shdb/msds/main.jsp>
6. 화학경제연구원 ChemLocus 화학용어사전, **2004** <http://www.chemlocus.co.kr/>
7. 노동부 고시 제2008-26호 「화학물질 및 물리적인자의 노출기준」, **2008**.
8. Organization for Economic Co-operation and Development(OECD), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (TG 471), **1997**.
9. 日本 労働省 化学物質調査課, 安衛法 変異原性試験, 中央労働災害防止協會, **1991**.
10. 김수진, 조해원, 임경택, 맹승희, 김현영. 1,2,4-trimethylbenzene의 미생물복귀돌연변이시험. *환경독성학 회지* **2006**, 21, 317-322.